

## 基础研究

## 维甲酸 受体介导全反式维甲酸抑制胃癌细胞生长的作用机理

吴乔 陈正明 刘苏 苏文金

**【摘要】目的** 探讨维甲酸受体(RAR)介导全反式维甲酸(ATRA)抑制胃癌细胞生长的作用机理。**方法** 应用 Northern blot 分析维甲酸受体在胃癌细胞中的表达水平,通过脂质体转染方法将 sense RAR 和 antisense RAR 分别转染到细胞中,通过 MTT 方法和软琼脂集落形成实验分析 ATRA 对转染细胞生长和恶性程度的影响,瞬时转染和测定氯霉素乙酰转移酶(CAT)活性,分析维甲酸应答元件(RARE)的转录活性。**结果** ATRA 诱导 BGC-823 细胞 RAR 表达,但不能诱导 MKN-45 细胞 RAR 表达。在转染细胞中,ATRA 可以抑制转 sense RAR 的 MKN 细胞生长,但不能抑制转 antisense RAR 的 BGC 细胞生长。与 MKN-45 细胞比较,ATRA 诱导 MKN/RAR 细胞 RARE 的转录活性较高,但与 BGC-823 细胞比较,ATRA 诱导 BGC/aRAR 细胞 RARE 的转录活性则较低。**结论** 足够量的 RAR 对于介导 ATRA 抑制胃癌细胞生长作用是必需的。

**【关键词】** 胃肿瘤; 维甲酸; 维甲酸受体; 基因转染

**Mechanism of retinoic acid receptor-mediated growth inhibition of gastric cancer cells by all-trans retinoic acid** WU Qiao, CHEN Zhengming, LIU Su, et al. The State Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**【Abstract】Objective** To study the mechanism of retinoic acid receptor (RAR) in mediating growth inhibition of gastric cancer cells by all-trans retinoic acid(ATRA). **Methods** Expression of RAR<sub>α</sub> was detected by Northern blot. After anti-sense RAR or sense RAR had been transfected into gastric cancer cell lines BGC-823 and MKN-45 respectively, the inhibitory effect of ATRA on cell growth in stable clones was analyzed using MTT assay and colony forming assay in soft agar. The transcriptional activation of retinoic acid response element (RARE) was measured by CAT assay. **Results** ATRA could induce expression of RAR in BGC-823 cells, but not in MKN-45 cells. In stable clones, ATRA could inhibit growth of MKN-45 cells transfected with RAR gene, but could not inhibit that of BGC-823 cells transfected with antisense RAR. Transient transfection and CAT assay showed higher -RAR response element (RARE) transcriptional activation induced by ATRA in MKN-45 cells transfected with RAR gene compared to parental MKN-45 cells, while lower RARE transcriptional activation was seen in BGC cells transfected with antisense RAR gene compared to parental BGC-823 cells. **Conclusion** Sufficient level of RAR is required for growth inhibition of gastric cancer cells by ATRA.

**【Subject words】** Stomach neoplasms; Retinoic acid; Retinoic acid receptor; Gene transfection

维甲酸(retinoic acid, RA)的作用主要由其受体——维甲酸受体(retinoic acid receptor, RAR)和维甲类 X 受体(retinoid X receptor, RXR)介导,它们属于类固醇/甲状腺激素受体超家族成员,由 3 种不同基因、和 编码,由此形成不同的受体亚类<sup>[1]</sup>。许多证据表明,RAR 活性的改变与某些疾病相关。在急性早幼粒细胞白血病中,当染色体发生 t(15;17)易位时,导致异常 PML-RAR 融合受体的产生,并引

起非正常的 RAR 转录<sup>[2]</sup>。在肺癌中,靠近 RAR 基因区的染色体 3P 短臂经常发生缺失<sup>[3]</sup>,人乳腺癌细胞由于不表达 RAR 而对 RA 产生抗性<sup>[4]</sup>。因此,探讨 RAR 的功能作用对于阐明 RA 的抗癌机制具有重要意义。

## 材料与方法

1. 胃癌细胞株和药物处理: BGC-823 和 MKN-45 细胞购于上海细胞所细胞库, RPMI-1640 培养液培养。10<sup>-6</sup> mol/L 全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA; Sigma 公司)处理细胞。
2. RNA 提取和 Northern blot: 细胞经 ATRA 处理

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39880015); 国家杰出青年科学基金(B 类)资助项目(39825502)

作者单位: 361005 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室

24 h 后,硫氰酸胍提取和氯化铯超速离心制备总 RNA,Northern blot 按文献[5]方法。探针 RAR、RAR、RAR 和 RXR 由美国加州 Burnham 研究所张晓坤博士惠赠。以 28S 和 18S 定量所用的 RNA 量。

3. 基因转染和细胞形态观察:克隆有 antisense RAR 和 sense RAR 质粒的表达载体(张晓坤博士惠赠)通过脂质体(Gibco BRL)介导方法转染到细胞中,空白载体(pRC/CMV)作为对照,G418 筛选细胞,Northern blot 确定 RAR 表达,观察克隆细胞形态。

4. 细胞生长测定:以 1 000 细胞/孔接种量将细胞接种在 96 孔板,ATRA 处理细胞 9 d,MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-6-yl)-6,5-diphenyltetrazolium bromide]方法测定细胞生长率<sup>[6]</sup>。

5. 软琼脂集落形成测定:0.5%琼脂作为底层,在 0.3%琼脂中加入细胞,使细胞终浓度为  $1 \times 10^5$ /ml(实验组则同时加入 ATRA),混匀后取 1 ml 铺展在底层琼脂上,凝固后置 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,3 周后计数集落形成数(直径 > 80  $\mu$ m 集落为阳性)。

6. DNA 瞬时转染和氯霉素乙酰转移酶(CAT)测定:脂质体介导方法将报告基因 RARE-tk-CAT(张晓坤博士惠赠)瞬时转染到细胞中,转染后,细胞经 ATRA 处理 24 h,测定 CAT 活性<sup>[6]</sup>。

## 结 果

1. RAR、RAR、RAR 和 RXR 在胃癌细胞中的表达:Northern blot 分析表明,RAR 在 BGC-823 细胞中表达水平较高,在 MKN-45 细胞中表达水平很低。ATRA 诱导后,BGC-823 细胞 RAR 表达水平显著提高,而 MKN-45 细胞 RAR 表达水平不变。RAR 在 BGC-823 细胞表达,在 MKN-45 细胞不表达;RAR 在两株细胞中均不表达,RXR 在两株细胞中低水平表达。然而,ATRA 都不能诱导两株细胞的 RAR、RAR 和 RXR 表达(图 1)。

2. 转染基因在胃癌细胞中的表达:根据以上结果,将 antisense RAR 和 sense RAR 分别转染到 BGC-823 和 MKN-45 细胞。Northern blot 显示,BGC/aRAR 细胞的 RAR 表达受到抑制,表达水平比 BGC-823 细胞低,而且 ATRA 不能诱导其表达,但可以诱导转空白载体细胞 BGC/vector 的 RAR 表达(图 2A)。相反,MKN/RAR 细胞的 RAR 表达不仅比 MKN-45 细胞提高,而且 ATRA 能够诱导其表达,但不能诱导 MKN/vector 的 RAR 表达(图 2B)。与 MKN-45 细胞多边形形态比较,MKN/RAR 细胞变为细长形,突起消失,圆形细胞增多,而 BGC/aRAR 细

胞形态则与 BGC-823 细胞类似。

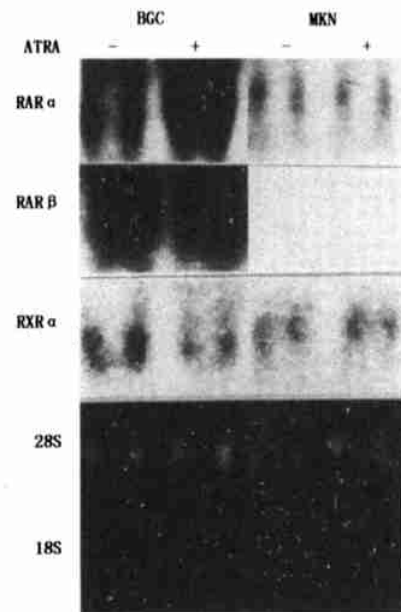
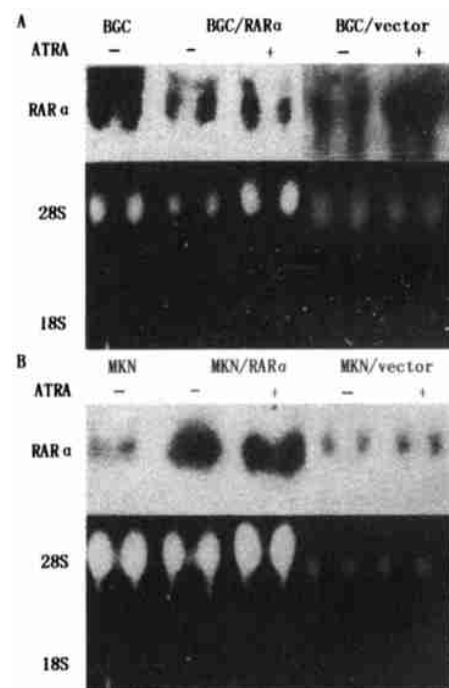


图 1 ATRA 对胃癌细胞中 RAR、RAR 和 RXR 转录水平的影响



A: BGC/aRAR 细胞; B: MKN/RAR 细胞

图 2 RAR 在转染细胞中的表达

3. ATRA 对细胞生长的影响:ATRA 可以有效抑制 BGC-823 细胞生长,但不能有效抑制 BGC/aRAR 细胞生长,抑制率从 61.0%下降到 18.4%。相反,ATRA 不能抑制 MKN-45 细胞生长,但可以抑制

MKN/RAR 细胞生长,抑制率从 3.9% 上升到 31.7%。

4. ATRA 对细胞软琼脂集落形成能力的影响: ATRA 可以抑制 BGC-823 和 MKN-45 细胞在软琼脂中形成集落的能力,但对 BGC-823 细胞的抑制率 (35.7%) 比对 MKN-45 细胞的抑制率 (23.2%) 高。相反,转染细胞中 ATRA 对 MKN/RAR 细胞形成集落的抑制率 (96.1%) 大于 BGC/aRAR 细胞 (20.0%)。

5. ATRA 对维甲酸应答元件 RARE 转录活性的调节:当报告基因 RARE-tk-CAT 瞬时转染后,在 BGC-823 细胞中,ATRA 可以诱导一个较强的 CAT 活性,诱导倍数 (即 ATRA 诱导的 CAT 活性/对照组的 CAT 活性) 为 3.36,而对 MKN-45 细胞的诱导倍数为 1.3。相反,转染细胞中 ATRA 不能显著诱导 BGC/aRAR 细胞的 CAT 活性,诱导倍数仅为 1.8,但对 MKN/RAR 细胞的诱导倍数则上升为 2.75。

## 讨 论

RA 的作用主要由其受体 RAR<sub>s</sub> 和 RXR<sub>s</sub> 介导。Northern blot 分析表明,ATRA 可以诱导 BGC-823 细胞 RAR 表达,但不能诱导 RAR<sub>α</sub>、RAR<sub>β</sub> 和 RXR 表达,提示 RAR 可能参与 ATRA 抑制胃癌细胞生长的过程。RA 激活的 RAR 与 RXR 形成异源二聚体,可以结合到维甲酸应答元件 (如 RARE) 上,由此调控基因的转录和表达<sup>[4]</sup>。在急性早幼粒白血病细胞和 RA 抗性的成神经细胞瘤细胞中,RA 可以诱导 RAR 表达,这种上调作用是由于 RA 诱导 RAR 基因启动子上的 RARE 基元序列 (motif)<sup>[7]</sup>。本研究中,当报告基因 RARE-tk-CAT 转染到 BGC-823 细胞时,ATRA 可以显著诱导 RARE 活性 (即 CAT 活性),表明 BGC-823 细胞的 RAR 具有功能性,在 ATRA 存在下激活 RARE 而刺激细胞生长抑制信号,从而抑制 BGC-823 细胞生长。但是,当报告基因转染到 MKN-45 细胞时,ATRA 诱导的 RARE 活性很低,提示在 MKN-45 细胞中 RARE 转录调节可能发生异常,或者 RAR 功能丧失,ATRA 不能抑制 MKN-45 细胞生长。

在成神经细胞瘤中,低水平表达 RAR 与预后

效果差密切相关<sup>[8]</sup>,这是由于 RAR 受体反映了肿瘤分化的特殊阶段。已知 RAR 在人组织分化过程中具有重要作用,在造血细胞中,RAR 表达丰富,但当染色体发生 t(15;17) 和 t(11;17) 易位时,RAR 受体发生变化,导致造血细胞分化受阻<sup>[9]</sup>。当将 sense RAR 基因转染到 MKN-45 细胞时,ATRA 通过对 RAR 的诱导而抑制细胞生长和降低细胞形成集落的能力。相反,当 antisense RAR 转染到 BGC-823 细胞后,ATRA 不能诱导 RAR 表达,细胞由对 ATRA 敏感转为抗性,形成集落的能力上升。由此证实,RAR 在介导 ATRA 抗胃癌细胞生长和抑制细胞恶性化方面起着关键作用。RAR 功能丧失可能导致细胞失去这种调节机制,从而表现出对 ATRA 抗性。

另外,当 RAR 基因转染到 MKN-45 细胞后,细胞形态由多边形变为细长形,圆形细胞数量增多,这种变化与 ATRA 存在与否无关,表明细胞形态的改变是由于基因转染引起的。至于圆形细胞的增多是否与细胞凋亡或其他因素有关,尚需进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 Zhang XK, Pahl M. Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 1993, 4:156-162.
- 2 Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, et al. Acute promyelocytic leukemia from genetics to treatment. *Blood*, 1994, 83:10-17.
- 3 Gebert JF, Moghal N, Frangioni JV, et al. High frequency of retinoic acid receptor abnormalities in human lung cancer. *Oncogene*, 1991, 6:1856-1863.
- 4 Lui Y, Lee MO, Wang HG, et al. Retinoic acid receptor mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol*, 1996, 16:1138-1149.
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993. 10-11.
- 6 吴乔,曾定,苏文金,等. 视黄酸受体转录水平的改变与乳腺癌细胞生长的关系. *厦门大学学报 (自然科学版)*, 1997, 36:787-794.
- 7 Snarda J, Sugaman J, Glass C, et al. Retinoic acid receptor alpha suppresses transformation by v-myc. *Mol Cell Biol*, 1995, 15:2474-2492.
- 8 Marshall GM, Cheung B, Stacey KP, et al. Regulation of retinoic acid receptor alpha expression in human neuroblastoma cell lines and tumor tissue. *Anticancer Res*, 1993, 13:437-449.
- 9 Grignani F, Ferruci PF, Testa U, et al. The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RAR-alpha fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells. *Cell*, 1993, 74:423-448.

(收稿日期:1999-10-18)